GLYKOGENGEHALT UND PHOSPHORYLASEAKTIVITÄT IN LINSEN VERSCHIEDENER SPEZIES WÄHREND DER ENTWICKLUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
URSULA HESSENBRUCH
aus Bendorf/Rh.

Bonn 1980

GLYKOGENGEHALT UND PHOSPHORYLASEAKTIVITÄT IN LINSEN VERSCHIEDENER SPEZIES WÄHREND DER ENTWICKLUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
URSULA HESSENBRUCH
aus Bendorf/Rh.

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Kaskel
2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Wittkowski

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung Biochemie des Auges
(Abteilungsvorsteher: Professor Dr. rer.nat.Otto Hockwin)
des klinischen Instituts für experimentelle
Ophthalmologie der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. Erich Weigelin)

Druck: Richard Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Fragestellung	5
2. Einleitung	6
2.1. Historischer Überblick	6
2.2. Allgemeiner Überblick über die Linsenentwicklung	8
2.3. Allgemeiner Überblick über den Glykogenstoffwechsel	9
3. Experimenteller Teil	12
3.1. Material und Methode	12
3.2. Ergebnisse	15
3.3. Übersicht über die Ergebnisse	26
4. Diskussion	27
5. Zusammenfassung	30
6. Literaturverzeichnis	31
7. Lebenslauf	37

1. Fragestellung

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Glykogen und die zum Glykogenstoffwechsel gehörenden Enzyme in der Augenlinse vorkommen. Weiter geht aus histochemischen und biochemischen Untersuchungen an älteren Linsen verschiedener Spezies hervor, daß Glykogen im Linsenkern in höherer Konzentration vorhanden ist als in der Linsenrinde. Auch ergaben diese Untersuchungen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies.

Es wurde diskutiert, ob Glykogen in seiner physikalischen Funktion als Makromolekül bezüglich des Brechungsindex eine Rolle spiele.

Heute scheint es wahrscheinlicher, daß Glykogen als Energiereservoir für den Kohlenhydratstoffwechsel von Bedeutung ist. Besonders in der alternden Linse wäre dieser Aspekt interessant, da hier der Kern als ältester Teil der Linse einen relativ hohen Gehalt an Glykogen aufweist und am weitesten vom versorgenden Kammerwasser entfernt liegt. Da Störungen im Energiestoffwechsel zur Linsentrübung führen können, interessiert die Frage, welche Rolle dem Glykogen als Kohlenhydratspeicher und Energielieferant in der Linse zukommt.

Phosphorylaseaktivität wurde in vorangegangenen histochemischen Untersuchungen im Linsenepithel aller untersuchten Spezies mit Ausnahme der Taube gefunden. Auch in der Linsenrinde von Mensch, Meerschweinchen, Ratte und Kaninchen konnte Phosphorylaseaktivität festgestellt werden, während die Linsenrinde von Kälbern weniger, die von Tauben keine Aktivität erkennen ließen. In der Linsenkapsel und im Linsenkern zeigte sich bei keiner Spezies Aktivität.

Die vorliegende Arbeit untersucht mit histochemischen Methoden die Veränderung des Glykogengehaltes und der Phosphorylaseaktivität während der Linsenentwicklung. Bisher wurde lediglich biochemisch die Rinderlinse unter diesem Gesichtspunkt untersucht.

Dabei wurde ein Anstieg des Glykogens in Rinde und Kern festgestellt. Die spezifische Aktivität der Phosphorylase stieg in der Äquatorgegend bis zum dritten Lebensjahr an und sank danach wieder ab. In anderen Linsenbezirken sank die Phosphorylase gleich nach der Geburt ab.

2. Einleitung

2.1. Historischer Überblick

Erste Untersuchungen über den Glykogenstoffwechsel wurden von SÜLLMANN (1937) und WEEKERS und SÜLLMANN (1938) durchgeführt. Sie fanden, daß Glykogen nicht durch die intakte Linsenkapsel eindringen kann, daß andererseits aber das Linsengewebe die Fähigkeit besitzt, Glykogen abzubauen. Diese Tatsache erlaubte den Schluß, daß alle am Glykogenstoffwechsel beteiligten Enzyme in der Linse vorhanden sein müßten. Der eigentliche Glykogennachweis erfolgte erst durch KAMEI (1958) mit biochemischen Methoden sowie durch ARKIN, MADALINSKI, TRZCINSKA (1959) mit histochemischen Methoden. Bei Untersuchungen von RABAEY (1963) zeigte sich in den Linsenkernen fliegender Vögel ein besonders hoher Glykogengehalt. Er folgerte daraus, daß Glykogen im zentralen Linsenanteil den Brechungsindex erhöhe und somit bei der Akkommodation eine wichtige Rolle spiele. In diesem Zusammenhang wurde erwogen, ob Glykogen hier die Funktion eines niedermolekularen Proteins übernehme, welches bei diesen Flugvögeln nur in geringem Maße oder gar nicht vorhanden ist. Daran schlossen sich Untersuchungen von KLETHI und MANDEL (1962) an der Rattenlinse an, sowie Untersuchungen von HOCKWIN und SCHÄFER (1963) und SCHÄFER (1965) an der Rinderlinse. Letztere Autoren fanden, daß mit zunehmendem Alter der Rinderlinsen die Gesamtmenge an Glykogen zunimmt. NORDMANN (1963) weist auf Zusammenhänge zwischen Glykogengehalt und Galactosekatarakt hin. TIMM (1964) stellt in einem Fall von Galactosämie einen deutlich erhöhten Glykogengehalt in der Linse fest. ABDULLAEV (1963) konnte an Kaninchen und Hunden eine deutliche Abnahme des Glykogengehaltes der Linsen nach Röntgenbestrahlung aufzeigen. SCHMACK (1966) untersuchte den Glykoge

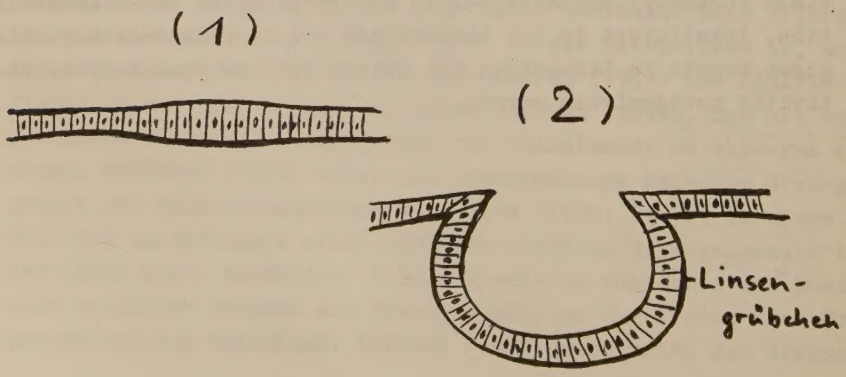
gehalt in Kälber- und Rinderlinsen. Er fand dabei einen Glykogenanstieg unter anaeroben Bedingungen bei entsprechendem Substratangebot. RÖCHLING (1968) gelang es mit histochemischen Methoden in Taubenlinsen Glykogen nachzuweisen. Dieses Ergebnis wurde von HOCKWIN, KASKEL und SCHEDTLER (1973) bestätigt. Sie fanden bei der Untersuchung von Linsen verschiedener Spezies mittels histochemischer und biochemischer Methoden für die Taube einen beträchtlich höheren Glykogengehalt als für die anderen untersuchten Spezies. Dabei lag der Glykogengehalt im Kern deutlich höher als in anderen Linsenarealen, was spätere Untersuchungen von KASKEL, SCHEDTLER, HOCKWIN und CIOLO (1975) erneut bestätigten. OHRLOFF, HOCKWIN und KASKEL (1973) untersuchten mit biochemischen Methoden verschiedene Enzymaktivitäten des Glykogenstoffwechsels an Rinderlinsen und kamen zu dem Ergebnis, daß diese relativ hoch und mit denen der Leber vergleichbar seien, während der Gesamt-Glykogengehalt eher niedrig sei. HOCKWIN (1973) stellte bei Bestimmungen der Enzymaktivitäten des Glykogenstoffwechsels und ihrer Umsatzraten fest, daß der zentrale Linsenanteil bei niedriger Substratkonzentration eine höhere Umsatzrate aufweist.

SHANTHAVERAPPA et al. (1966) wiesen Phosphorylase in Randschichten der Linsenepithelzellen nach, mit histochemischen Methoden. KASKEL, SCHEDTLER, HOCKWIN, CIOLI (1974) untersuchten ebenfalls histochemisch einige Enzyme des Glykogenstoffwechsels. Sie fanden in allen Linsen der untersuchten Spezies außer in der Taubenlinse Phosphorylaseaktivität in unterschiedlich hoher Konzentration, lokalisiert in der Linsenrinde und im Linsenepithel; hingegen konnte im Linsenkern bei keiner Spezies Phosphorylaseaktivität nachgewiesen werden.

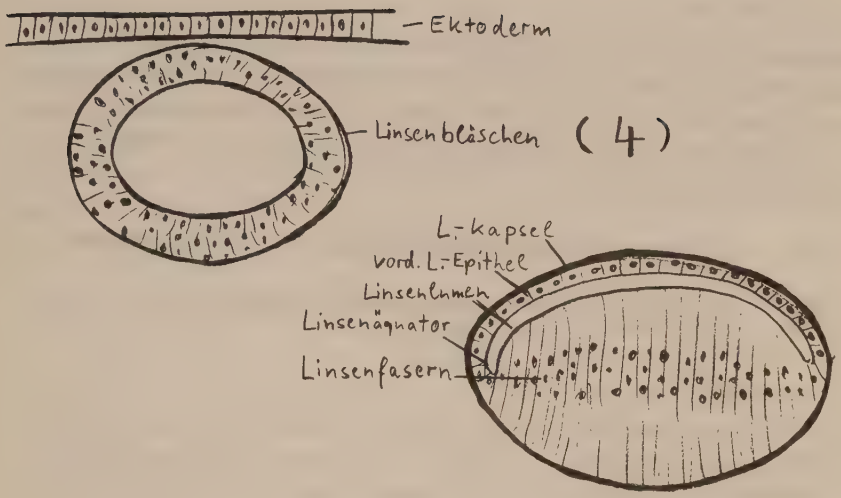
2.2. Allgemeiner Überblick über die Linsenentwicklung

Die Linse ist ein Organ ektodermaler Herkunft. Die primäre Augenblase als Ausstülpung des Zwischenhirns, welche später Netzhaut, Pigmentepithel, Fasciculus opticus und Glaskörper bildet, veranlaßt durch Induktion die Linsenentwicklung. Dort nämlich, wo sie das Ektoderm von innen berührt, entsteht als Epithelverdickung die Linsenplatte (1). Diese senkt sich als Linsengrube (2) in die Öffnung des Augenbechers. Die Ränder berühren sich und verschmelzen; damit löst sich das so entstandene Linsenbläschen (3) vom Ektoderm ab und liegt frei im Augenbecher. Es füllt zunächst den Glaskörperraum ganz aus. Die Zellen des Linsenbläschens scheiden nach außen eine homogene Cuticula aus, die Linsenkapsel. Die Vorderwand des Linsenbläschens bleibt einschichtig und bildet das vordere Linsenepithel. Die Zellen der hinteren Linsenwand verlängern sich mehr und mehr und werden zu Linsenfasern. Der Übergang von Vorder- zu Hinterwand ist der Linsenäquator. Er stellt die Nachschubzone für neue Linsenfasern dar (4).

Um die Linse herum bildet sich eine blutgefäßführende Bindegewebsschicht, die Tunica vasculosa lentis, deren Gefäße von der A. hyaloidea und den Ziliargefäßen stammen. Später muß die Linse aus ihrer Umgebung ernährt werden, da sich die Gefäßkapsel der Linse und die A. hyaloidea zurückbilden und die Linse selbst keine Blutgefäße besitzt.



(3)



(s. auch Abb. 7/8)

2.3. Allgemeiner Überblick über den Glykogenstoffwechsel

Glykogen bildet als Reservekohlenhydrat einen rasch mobilisierbaren Energievorrat. Das zur Mobilisierung notwendige Enzym ist Glucose-6-phosphatase, welches lediglich in Leber und Niere vorkommt. Die Glucoseeinheiten sind jeweils α-glykosidisch zwischen C_1 und C_4 verbunden. Zusätzlich sind die Verzweigungsstellen an C_6 der Hauptkette ebenfalls α-glykosidisch verbunden. Das bedeutet, daß jedes Glykogenmolekül genau eine offene Aldehydgruppe besitzt, während alle übrigen Aldehydgruppen als Halbacetal vorliegen. Man weiß sicher, daß Glykogenaufbau und -abbau über weit-

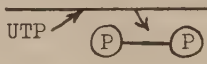
gehend verschiedene Enzymsysteme verlaufen, wobei einzelne Enzymreaktionen aus thermodynamischen Gründen irreversibel sind.

Glykogenaufbau:

Um eine C_1-Verknüpfung zu erzielen wird Glucose-6-Phosphat durch die Phosphoglucomutase in Glucose-1-Phosphat überführt, dessen stationäre Konzentration sehr niedrig liegt. Daher wird es nur zu einem geringen Teil in Umkehrung der Phosphorylasereaktion in Glykogen eingebaut.

Glucose-6-Phosphat $\rightleftharpoons$ (Phosphoglucomutase) Glucose-1-Phosphat

Glucose-1-Phosphat $\xrightarrow[\text{UTP}]{\text{UDPG-Phosphorylase}}$ UDP-Glucose



Durch die Bildung von UDPG wird das Energieniveau der Glucose angehoben. Anschließend wird mit Hilfe der Glykogensynthetase (UDPG-Glykogen-Glykosyltransferase) der Glucoserest auf das als Acceptor dienende Polysaccharid übertragen und mit einer C_4-Gruppe des Polysaccharids an C_1 α-glykosidisch verknüpft.

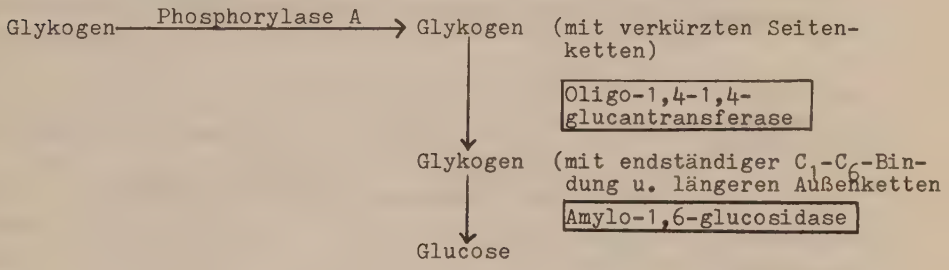
UDP-Glucose $\xrightarrow[\text{UDP}]{\text{Glykogensynthetase}}$ Glykogen (1,4-Glykosylreste

Das als Acceptor dienende Grundskelett ("primer") entsteht möglicherweise durch Zerfall höhermolekularen Glykogens und kann nicht z.B. durch Glucose ersetzt werden.

Die verzweigten Stellen entstehen durch das sog. "branching enzyme", die Amylo-1,4-1,6-Transglucosidase, jeweils nach Erreichen von ca. 12 bis 2o Glucoseeinheiten, indem 3 bis 6 Glucoseeinheiten vom Kettenende her nach innen verschoben werden und dort in 1,6 Konfiguration mit dem Grundskelett verbunden werden. So entsteht an jedem 3. und 5. Glucosemolekül eine Verzweigungsstelle; die Kettenenden bestehen aus ca. 12 bis 15 unverzweigten Glucoseeinheiten.

Glykogenabbau:

Der Glykogenabbau erfolgt über die Phosphorylase. Eine regulierende Rolle spielt dabei wahrscheinlich die stationäre Konzentration des Glucose-1-Phosphats. Die Phosphorylase baut die Außenketten des Glykogens bis auf 4 Glucoseeinheiten vor der nächsten Verzweigungsstelle ab. Das nächste Enzym (Oligo-1,4-1,4-glucantransferase) überträgt dann die 3 Glucoseeinheiten vor der Verzweigung auf längere Außenketten, somit bleibt 1 Glucosemolekül in C_1-C_6-Bindung an der Hauptkette zurück. Dieser Rest wird hydrolytisch gespalten durch das sog. "debranching enzyme", die Amylo-1,6-glucosidase, welche freie Glucose entstehen läßt.



Regulation:

In den Regulationsmechanismus greifen sowohl Metabolitenkonzentrationen als auch hormonelle Wirkungsmechanismen ein. Sowohl Phosphorylase als auch Glykogensynthetase, die beiden Schlüsselenzyme, liegen in aktiver und inaktiver Form vor. Die Phosphorylase wird durch Phosphorylierung aktiviert, während die Glykogensynthetase durch diesen Vorgang inaktiviert wird. Die aktive Form der Phosphorylase ist die Phosphorylase A, ihre inaktive Form ist die Phosphorylase B, welche der nicht phosphorylierten Form entspricht. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen. Die Aktivierung der Kinasen kann durch "Zyklo-AMP" erfolgen, das aus ATP unter der Wirkung einer Magnesium-abhängigen Adenylzyklase entsteht.

3. Experimenteller Teil

3.1. Material und Methode

Histochemische Untersuchungen wurden durchgeführt an Linsen von Kaninchen (Stamm: Riesenschecken), Meerschweinchen (glatte, einfache Meerschweinchen), Ratten (Stamm: Han "Wistar") und Tauben (Stamm: Fabry-Gossen) in fünf verschiedenen Entwicklungsstadien und zwar nach halber (Stadium I) und 2/3 Tragzeit (Stadium II), am Geburtstermin (Stadium III); als Stadium IV wurde genau der Zeitpunkt zwischen Geburtstermin und Geschlechtsreife gewählt. Als Stadium V wurden die Linsen von geschlechtsreifen Tieren untersucht. Die jeweiligen Termine wurden vom Züchter angegeben. Das genaue Linsenalter ist aus Tabelle 1 zu ersehen.

Tiere \ Stadien	I	II	III	IV	V
	1/2 der Tragzeit bzw. der Brutzeit	2/3 der Tragzeit bzw. der Brutzeit	Ende der Tragzeit bzw. der Brutzeit	Mitte zwischen Geburt und Geschlechtsreife	geschlechtsreife Tiere
Kaninchen	16	21	3o	6o	12o
Meerschweinchen	34	46	68	3o	6o
Ratte	-	14	2o	3o	65
Taube	9	12	18	75	18o

Für die Untersuchung der ersten drei Entwicklungsstadien wurden die Bulbi aller Tiere eines Wurfes aufgearbeitet; die beiden Entwicklungsstadien nach der Geburt wurden lediglich anhand der Augen eines Tieres untersucht.

Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte im vierten und fünften Entwicklungsstadium wurden durch eine Überdosis Nembutal^{R} (6o mg Pentobarbital-Natrium/kg Körpergewicht) getötet; die anderen Tiere wurden dekapitiert.

Unmittelbar nach dem Tod der Tiere wurde der Bulbus entnommen und mit CO_2-Trockeneis tiefgefroren. Im Dittes-Kryostaten wurden bei $-25^{o}C$ mit dem Kältemikrotom Sagittalschnitte von 14 µm angefertigt. Diese Schnitte wurden auf mit Aceton gereinigte Objektträger von

Zimmertemperatur gebracht. Die Präparate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -25°C aufbewahrt.

Glykogennachweis:

Glykogen wurde mit der PAS-Reaktion nach HOTCHKISS und Mc MANUS (ROMEIS 1968) nachgewiesen, nachdem die Schnitte zuvor mit Celloidin (1%) behandelt worden waren. Das Prinzip der PAS-Reaktion ("perjod acid Schiff's-reaction") beruht auf der Rotfärbung von zwei dichtgelagerten Aldehydgruppen mit Schiff's Reagenz. Mit Hilfe der Perjodsäure erfolgt eine gezielte Hydrolyse von Kohlenhydraten, wobei 1,2-Glykolgruppen zu Aldehyden oxidiert werden. Außer Glykogen ergeben auch eine PAS-positive Reaktion: Kerasin Cerebroside, Acetalphophatide, Ganglioside, Mucoproteide und Glykoproteide.

1,2-Glykolgruppen (Glykogen, u.a.) —Perjodsäure→ Aldehyde (mit Schiff´Reagenz: rote Farbreaktion)

Daher wurden zur Kontrolle Schnitte in einer Lösung von 5o mg% Amylo-1,4-1,6-glucosidase (1o mg/2o ml Acetatpuffer) für 12o Min. bei 37°C inkubiert. Nach Spülen mit Acetatpuffer (pH 4,8) wurden die Schnitte anschließend durch die PAS-Reaktion gefärbt. Bei den sich nach dieser Behandlung rot darstellenden Substanzen handelt es sich nicht um Glykogen. Weitere Kontrollschnitte wurden statt mit Perjodsäure mit Kaliumjodat behandelt, wodurch die Bildung von Aldehyden verhindert wurde und keine der oben erwähnten Substanzen mit Schiff's Reagenz eine Rotfärbung ergibt.

Phosphorylasenachweis:

Die Phosphorylaseaktivität wurde mit der Methode nach TAKEUCHI und KURIAKI (1955), ERANKÖ und PALKAMA (1961), IBRAHIM und CASTELLANI (1968) nachgewiesen (Pearse, 1972). Mit dieser Methode wird die Gesamt-Phosphorylase erfaßt. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung von Glucose-1-Phosphat, das als Substrat dient, zu Amylase, welche durch Jod nachzuweisen ist.
Die Gefrierschnitte wurden für 5-1o Minuten in Aceton (4°C) gestellt,

anschließend luftgetrocknet und für eine Stunde bei 37°C in folgender Lösung inkubiert:

100 ml 0,1 m Acetatpuffer (pH 5,9)
1 g Glucose-1-Phosphat
100 mg Adenosin-5-Phosphat
20 mg Glykogen
1,8 g NaF
9 g Polyvinylpyrrolidon
10 Tropfen Insulin (40 I.U./ml)

Zu 2,5 ml dieser Inkubationslösung wurden 0,5 ml absoluter Alkohol hinzugefügt.

Danach wurden die Präparate kurz in 40%igem Alkohol gespült, luftgetrocknet, 30 Minuten in abs. Alkohol fixiert und wiederum luftgetrocknet. Daraufhin erfolgte die Färbung mit Lugol'scher Lösung (1:10) für 5 Minuten. Sodann wurden die Schnitte in Glycerin-Gelatine-Lugol'scher Lösung (5:1) eingedeckt.

Die Reaktion ist sehr flüchtig und wurde daher sofort mit Kontrollschnitten verglichen und fotografiert.

3.2. Ergebnisse

Glykogengehalt in der Kaninchenlinse:
In den ersten beiden Entwicklungsstadien ist kein mit histochemischen Methoden nachweisbares Glykogen vorhanden. Ab Stadium III kann eine leichte, diffus über den ganzen Linsenschnitt verteilte Rotfärbung festgestellt werden, die bis zur nächsten untersuchten Entwicklungsstufe (Stadium IV) zunimmt und im Zentrum deutlicher ist. Beim fertilen Tier (Stadium V) konzentriert sich die Farbreaktion im Linsenkern stärker, die Peripherie erscheint dagegen hell.

Abb. 1: [illegible]

Abb. 2: Kontrolle zu Abb. 1, Amylo-1,4-1,6-glucosidase

Glykogengehalt in der Meerschweinchenlinse:
Beim Meerschweinchen läßt sich schon im Stadium I der Entwicklung eine leichte Rotfärbung der Linsenfasern feststellen, die im Stadium II stärker wird und an der hinteren Linsenperipherie deutlicher als in den übrigen Linsenbereichen erscheint. Im Stadium III nimmt die Rotfärbung weiter zu und ist gleichmäßig über den ganzen Linsenschnitt verteilt. In den beiden Stadien nach der Geburt (Stadium IV und V) konzentriert sich die immer weiter zunehmende Färbung im Linsenkern.

Abb. 3: Meerschweinchen, Stadium III, Glykogenfärbung

Abb. 4: Kontrolle zu Abb. 3, Amylo-1,4-1,6-glucosidase

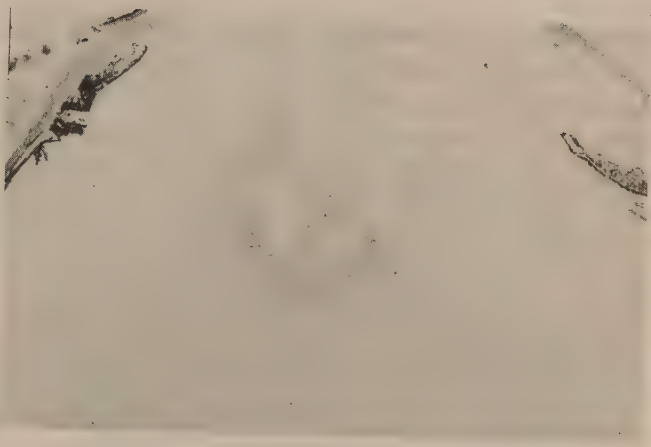


Abb. 5: Meerschweinchen, Stadium IV, Glykogenfärbung

Abb. 6: Kontrolle zu Abb. 5, Amylo-1,4-1,6-glucosidase

Glykogengehalt in der Rattenlinse:

Im Stadium I kann die Rattenlinse lichtmikroskopisch noch nicht dargestellt werden. Die Rattenlinse zeigt erstmals im Stadium IV der untersuchten Entwicklungsreihe einen Farbunterschied zwischen den Glykogen-positiven Präparaten und den Amyloglukosidase-Kontrollen. In diesem Stadium erscheint die Linsenperipherie weniger rot gefärbt als das Linsenzentrum. Im Stadium V nimmt die Reaktion im Linsenzentrum deutlich zu, während die Peripherie hell erscheint. Die Amyloglucosidase- und KJ-Kontrollen zeigen diese Reaktion nicht.

Der Glykogengehalt in der Taubenlinse:

Schon nach halber Brutzeit (Stadium I) zeigen die Linsenfasern eine so große Farbintensität wie bei keinem der anderen Tiere. Die Färbung erstreckt sich über die gesamte Linsenfaser vom hinteren bis zum vorderen Pol der Linse; lediglich im Bereich der Äquatorgegend ist eine nahezu ungefärbte Zone erkennbar.

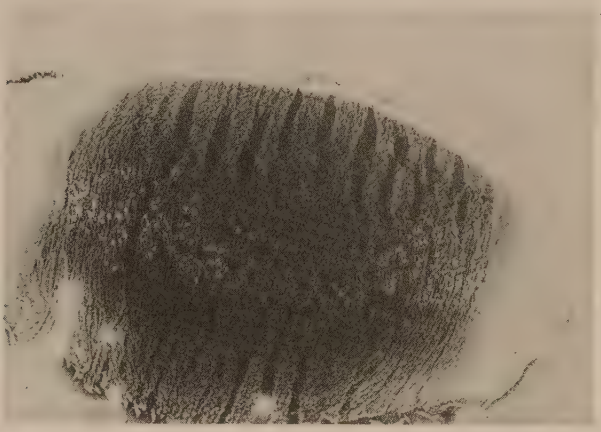


Abb. 7: Taube, Stadium I, positive Glykogenfärbung

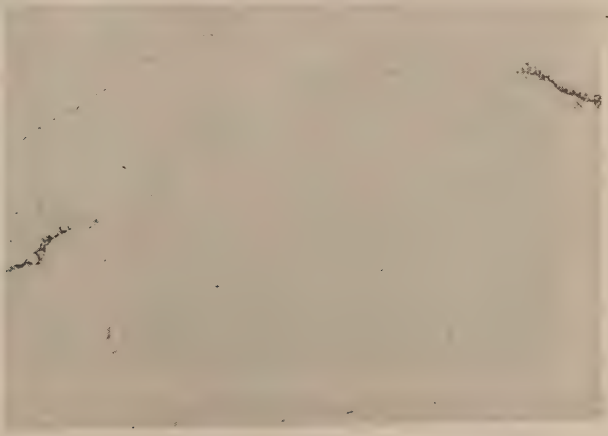


Abb. 8: Kontrolle zu Abb. 7, Amyloglucosidase vorbehandelt

Während der fötalen Weiterentwicklung nahm der Glykogengehalt kon-
tinuierlich zu. Seine Verteilung änderte sich nicht wesentlich.
Nach der Geburt (in den Stadien IV und V), konzentriert sich di
Färbung im Linsenkern, der tief rot erscheint und von einer helle
Rindenzone umgeben ist. Die Amyloglucosidase-Kontrollen zeigen kei
ne Färbung der zentralen Linsenfasern.

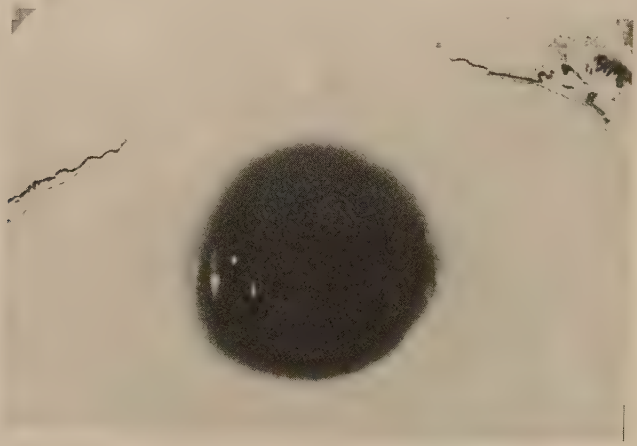


Abb. 9: Taube, Stadium IV, positive Glykogenfärbung

Abb. 1o: Kontrolle zu Abb. 9; mit Amyloglucosidase vorbehandelter Schnitt

Bei allen Spezies erscheint sowohl in den Glykogen-positiv gefärbten Schnitten wie auch in den mit Amyloglucosidase vorbehandelten Schnitten die Linsenkapsel rot gefärbt. Es sind also außer Glykogen hier andere Substanzen mit Schiff's Reagenz eine Reaktion eingegangen, so daß mit dieser Methode nichts über den Glykogengehalt der Linsenkapsel ausgesagt werden kann.

Die mit Kaliumjodat behandelten Schnitte weisen nirgends eine Rotfärbung auf.

Der Phosphorylasegehalt der Kaninchenlinse:

In den Stadien I und II ist keine positive Phosphorylase-Reaktion nachweisbar. Beim geburtsreifen Tier (Stadium III) zeigt sich deutliche Färbung im Linsenepithel, die im Stadium IV an Intensität zunimmt.

Abb. 11: Kaninchen, Stadium IV, positive Phosphorylase-Färbung

Abb. 12: Kontrolle zu Abb. 11; ohne Glucose-1-Phosphat

Im letzten Stadium (Stadium V) ändert sich das Bild nicht wesentlich. Die Reaktion bleibt auf das Linsenepithel beschränkt.

Der Phosphorylasegehalt der Meerschweinchenlinse:

Schon im Stadium I kann leichte Phosphorylasereaktion in der Äquatorgegend nachgewiesen werden. In den nachfolgenden Entwicklungsstadien steigt die Intensität der Färbung an; bereits im Stadium II kann im gesamten Linsenepithel die typische Jodreaktion beobachtet werden, die aber in Äquatornähe und im Kernbogen besonders deutlich hervortritt. Dieses Bild ändert sich erst im Stadium V, wo zusätzlich die Rindenregion nahe dem Äquator positive Reaktion zeigt.

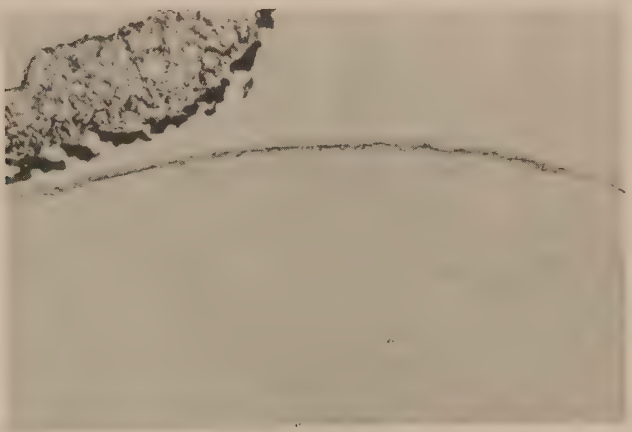


Abb. 13: Meerschweinchen, Stadium V, positive Phosphorylase-Färbung in [illegible]

Abb. 14: Kontrolle zu Abb. 13, ohne Glucose-1-Phosphat im Inkubationsmedium

Der Phosphorylasegehalt in der Rattenlinse:

Eine positive Reaktion ist erstmals nachweisbar am Ende der Tragzeit (Stadium III) als leichte grau-blaue Färbung im Linsenepithel, vorwiegend in Äquatornähe. In den beiden Stadien nach der Geburt nimmt die Reaktion stark zu und erscheint als fast schwarzes Band unter der vorderen Linsenkapsel; immer scheint die größte Aktivität im Äquatorbereich des Linsenepithels vorhanden zu sein. Die Reaktion bleibt aber auf das Linsenepithel beschränkt. Von Stadium IV nach Stadium V ist keine weitere Zunahme zu erkennen.

Abb. 15: Ratte, Stadium IV, positive Phosphorylasefärbung

Abb. 16: Kontrolle zu Abb. 15, ohne Glucose-1-Phosphat im Inkubationsmedium

Der Phosphorylasegehalt in der Taubenlinse:

In keiner der untersuchten Taubenlinsen konnte mit dieser Methode Phosphorylaseaktivität nachgewiesen werden.

3.3. Übersicht über die Ergebnisse

Tiere \ Stadien	I	II	III	IV	V
Kaninchen	-	(-)	+	+	+++ (Abb.1/2)
Meerschweinchen	(+)	+	++ (Abb.3/4)	+++ (Abb.5/6)	+++
Ratte	ø	-	-	+	+++
Taube	++++ (Abb.7/8)	+++++	++++++	+++++++ (Abb.9/1o)	++++++++

Tabelle 2: Übersicht über den Glykogengehalt der untersuchten Linsen

Tiere \ Stadien	I	II	III	IV	V
Kaninchen	-	-	++	+++ (Abb.11/12)	+++
Meerschweinchen	(+)	+	+	++	+++ (Abb.13/14)
Ratte	ø	-	(+)	+++ (Abb.15/16)	+++
Taube	-	-	-	-	-

Tabelle 3: Übersicht über den Phosphorylasegehalt der untersuchten Linsen

4. Diskussion

Zur Durchführung unserer Untersuchungen über Glykogengehalt und Phosphorylaseaktivität wurden bekannte histochemische Methoden angewendet. Trotz exakter Anwendung der oben beschriebenen Technik ergaben sich jedoch einige Unterschiede zu früheren Ergebnissen. Diese könnten einmal bedingt sein durch die unterschiedlich lange Zeit (1 - 4 Minuten) zwischen der Entnahme der Bulbi und dem Tiefgefrieren, da immer nur ein Auge nach dem anderen gefroren werden konnte. Es ist ja bekannt, daß schon unmittelbar nach Eintritt des Kreislaufstillstandes in der Retina der Glykogenabbau beginnt (KASKEL et al., 1973). Außerdem wählten wir für die Gefrierschnitte eine Dicke von 14 µm, während in früheren Arbeiten 25 µm dicke Schnitte angefertigt wurden (KASKEL et al. 1974, 1975), so daß dadurch Konzentrationsunterschiede im Glykogen- und Phosphorylasegehalt vorgetäuscht werden, die tatsächlich nicht vorhanden sind. Beim Vergleich mit den Ergebnissen o.g. Autoren ergab sich lediglich ein Unterschied bezüglich der Phosphorylaseaktivität in der Rinde von Kaninchen- und Rattenlinsen, wo wir keine Aktivität feststellen konnten. Lediglich in der Rinde erwachsener Meerschweinchen fanden wir mit der Methode nach Takeuchi und Kuriaki Phosphorylase. Zum anderen war die Anzahl der hier untersuchten "Tiere nach der Geburt" gering; da aber im Prinzip die Ergebnisse weitgehend mit den früheren Untersuchungen von KASKEL et al., 1974, 1975 übereinstimmen, glaubten wir, auf grö - ßeres Tiermaterial verzichten zu können.

Bei allen Spezies zeigte sich eine klare Tendenz in der Linsenentwicklung: Der Glykogengehalt steigt im Verlauf der Entwicklung an und konzentriert sich zunehmend im Linsenzentrum, d.h. die reifen Tiere weisen den größten Glykogengehalt auf und zwar im Linsenkern. Welcher Mechanismus zu dieser Glykogenanhäufung führt, kann bislang noch nicht erklärt werden.

Untersuchungen an der sich entwickelnden Rinderlinse (1/4 - 8 Jhr.) haben gezeigt (OHRLOFF et al., 1976), daß UDP-Glucose-Phosphorylase, ein Enzym der Glykogensynthese, und Phosphorylase, ein Enzym

des Glykogenabbaus, sowie Phosphoglucomutase, welche an beiden Prozessen teilnimmt, in allen Linsenregionen vorhanden sind. Es ergaben sich jedoch für alle untersuchten Altersstufen charakteristische Unterschiede der spezifischen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Lokalisation. Die Höchstwerte fanden sich am Äquator, geringere im vorderen und hinteren Linsenabschnitt und die niedrigsten Werte lagen im Linsenzentrum, also dort, wo zumindest in der reifen Linse immer die höchsten Glykogenkonzentrationen gefunden wurden.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Feststellung, daß Glykogen nicht von außen durch die intakte Linsenkapsel in die Linse gelangen kann (SÜLLMANN, 1937, WEEKERS u. SÜLLMANN, 1938), muß eine Glykogensynthese in der Linse angenommen werden, ebenso wie ein Glykogenabbau, der jedoch im Linsenkern nicht das Ausmaß der Glykogensynthese erreicht.

Die spezifische Aktivität von Enzymen aber läßt nicht unbedingt Rückschlüsse auf ihre in vivo vorhandene Aktivität zu, welche ja auch wesentlich vom Substratangebot mitbestimmt wird. Daher wurden von OHRLOFF et al. 1976 auch die jeweiligen Substratkonzentrationen in den entsprechenden Linsengebieten untersucht: UDP-Glucose, Glucose-1-Phosphat und Glucose-6-Phosphat. Diese Autoren stellten fest, daß die Substrate des Glykogenstoffwechsels in sämtlichen Abschnitten der untersuchten Kälber- und Rinderlinsen vorhanden sind. Sie schlossen daraus, daß alle Linsenabschnitte - auch der Kern - außer über die notwendigen Enzyme auch über ein ausreichendes Substratangebot für einen längeren Zeitraum verfüge, um Glykogen auf- und abzubauen. Außerdem nahmen sie trotz relativ niedriger Konzentrationen im Kern eine höhere Umsatzrate an, die auf einen aktiveren Energiestoffwechsel als in anderen Linsenabschnitten schließen lasse (HOLSTEGE, 1976).

Glykogen und Phosphorylase treten in der von uns durchgeführten Untersuchung an Kaninchen-, Meerschweinchen- und Rattenlinsen etwa gleichzeitig in der Entwicklung auf. Allerdings ist die Zeit des erstmaligen Auftretens von einer Spezies zur anderen unterschiedlich. Der Grund hierfür mag darin liegen, daß die Linsenentwicklung

bis zur Geburt bei den hier untersuchten Tieren nicht parallel verläuft, ebensowenig wie die Entwicklung des gesamten Föten. Man bedenke, daß die Meerschweinchenlinse, die sowohl für Glykogen als auch für Phosphorylase schon im frühesten Stadium positive Reaktion zeigt, eine lange intrauterine Entwicklung von 68 Tagen durchmacht. Das Neugeborene kommt mit geöffneten Augen zur Welt; die frühe Linsenentwicklung ist abgeschlossen. Bei der Ratte dagegen, mit einer Tragzeit von ca. 2o Tagen, sind die Augen der Jungen bei der Geburt geschlossen; die Linsenentwicklung ist noch nicht abgeschlossen. Trotzdem wurde in dieser Arbeit aus schematischen Gründen eine klare Zeiteinteilung nach Geburtstermin und Geschlechtsreife gewählt, wie aus Tab. 1 ersichtlich ist. Diese Tatsache gilt es zu berücksichtigen, wenn man die entsprechenden Entwicklungsstadien miteinander vergleicht.

Die Taube zeigt keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen Glykogengehalt und Phosphorylaseaktivität. Während ein besonders hoher Glykogengehalt schon vom ersten untersuchten Entwicklungsstadium an festgestellt werden konnte, war es mit unseren Methoden nicht möglich, Phosphorylaseaktivität in irgendeinem untersuchten Entwicklungsstadium zu finden. Es erscheint für den Kohlenhydratstoffwechsel sinnvoll, wenn Glykogen als Speichersubstanz und Phosphorylase als katabolisierendes Enzym in der Linse gleichzeitig auftreten. Aber die unterschiedliche Lokalisation von Substrat und Enzym, und die bislang noch nicht nachgewiesene Phosphorylase in der Taubenlinse lassen daran zweifeln, daß Glykogen allein ein Depot-Kohlenhydrat der Linse darstellt und als solches im Hungerzustand direkt verstoffwechselt wird. Das bedeutet, daß weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die Funktion des Glykogens in der Linse abzuklären.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit histochemischen Methoden Augenlinsen verschiedener Spezies (Taube, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte) in 5 Entwicklungsstadien auf ihren Glykogen- und Phosphorylasegehalt zu untersuchen.

Der Glykogengehalt aller untersuchten Spezies zeigte eindeutig die Tendenz, in der Entwicklung der Linse kontinuierlich zuzunehmen, wobei sich die durch PAS-Reaktion erzielte Rotfärbung bei den halbgeschlechtsreifen und geschlechtsreifen Tieren deutlich im Linsenkern konzentriert. Hierbei fällt besonders die Taube auf, bei der weitaus am meisten Glykogen, und zwar vom ersten untersuchten Entwicklungsstadium an, nachgewiesen werden konnte.

Der Phosphorylasegehalt in der Linse konnte durch lilablau bis blauschwarze Farbrekation außer bei der Taube bei allen übrigen untersuchten Spezies mit der Methode nach TAKEUCHI und KURIAKI nachgewiesen werden, lokalisiert in der Nähe des Äquators und im Linsenepithel. Auch hier zeigte sich mit zunehmendem Linsenalter eine Zunahme der Phosphorylasereaktion. Es fiel besonders die Meerschweinchenlinse auf, die bereits im ersten untersuchten Entwicklungsstadium leichte Phosphorylaseaktivität zeigte und darüber hinaus in der reifen Linse auch in der Rinde Aktivität aufwies.

6. Literaturverzeichnis

Abdullaev, V.M.: Histochemical examination of glycogen in the eyeball tissue in radiation sickness. Arch.Pat.(Mosk) 25, Nr. 3: 56-62 (1963)

Arkin, W., Madalinsky, W. u. Trzcinska, Z.: Sur le glycogène du cristallin et son métabolisme. 18. Concil. ophthal. 1958 belg., Acta 1: 693-698 (1959)

Bancroft, J.D.: An Introduction to Histochemical Technique, Butterworth and Co., London (1967)

Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie, Berlin (1971)

Dardenne, U. und Hockwin, O.: Änderungen des Linsenstoffwechsels in Abhängigkeit vom Lebensalter. Fortschr. Augenheilk. 17: 1-1o (1965)

Ferner, H.: Entwicklungsgeschichte des Menschen. Ernst Reinhard Verlag München/Basel

Förster, H. und Mehnert, H.: Kohlenhydratstoffwechsel, in W. Siegenthaler: Klinische Pathophysiologie. S. 34-92 Georg Thieme Verlag,Stuttgart, 2. Aufl. (1973)

Forgacs, J.: Aktivité enzymatic dans l'épithélium du cristallin du rat. Ophthalmologica 145, 272-278 (1961)

Friedburg, D. und Meyer, U.: Untersuchungen über den P-P-Zyklus in menschlichen Kataraktlinsen. V. Graefes Arch. Ophthal. 174, 367-376 (1968)

Gassner, R.: Untersuchungen von Fermentaktivitäten in den wasserlöslichen Eiweißfraktionen unterschiedlich alter Rinderlinsen und einzelner Linsenteile nach Trennung durch Gelfiltration. Diss. Bonn (1969)

Härkönen, M. und Tarkkanen, A.: Effect of phospholine iodide on energy metabolites of the rabbit lens. Expl. Eye Res. 1o: 1-7 (197o)

Hockwin, O.: Untersuchungen des Phosphatstoffwechsels von Linsen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie. V. Graefes Arch. Ophthal. 162, 339-345 (196o)

Hockwin, O.: The Presence of Glykogen in Lenses of Different Species. Expl. Eye Res. 15: 235-244 (1973)

Hockwin, O., Bergeder, H.D. und Kaiser, L.: Über die Galaktose Katarakt junger Ratten nach Ganzkörperbestrahlung. Ber. dtsch. ophthal. Ges. 68, 135-139 (1967)

Hockwin, O., Kaskel D. und Schedtler, Ch.M.: 13th Meeting Association for Eye Res., Budapest 1972; Abstract. Expl. Eye Res. 14, 173 (1972)

Hockwin, O. und Kleifeld, O.: Das Verhalten vorn Fermentaktivitäten in einzelnen Linsenteilen unterschiedlich alter Rinder und ihre Beziehung zur Zusammensetzung des wasserlöslichen Eiweißes. In: Die Struktur des Auges. II. Symp. Hrsg. J.W. Rohen, S. 395-4o1. Stuttgart: Schattauer (1965)

Hockwin, O. und Schäfer, B.: Über den Glykogengehalt in Linsen, Linsenrinde und Linsenkern verschieden alter Rinder. Ber. dtsch. ophthal. Ges. 65: 3o7-3o9 (1963)

Hockwin, O., Weimar, L., Noll, E. und Licht, W.: Fermentaktivitäten in der vorderen Schale, der hinteren Schale, dem Äquator und dem Kern unterschiedlich alter Rinderlinsen. V. Graefes Arch. Opthal. 17o: 99 (1966)

Holstege, A.: Untersuchungen von Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen des Glykogenstoffwechsels in Rinderlinsen in Abhängigkeit von Lebensalter und Lokalisation; Zuordnung der Phosphoglucomutase zu den Kristallinfraktionen. Diss., Bonn (1976)

Jansen, W.: Trennung der wasserlöslichen Eiweiße unterschiedlich alter Linsen und verschiedener Linsenteile durch Gelfiltration und Bestimmung verschiedener Fermentaktivitäten in den getrennten Fraktionen. Diss., Bonn (1966)

Kamei, T.: Phosphorylase in the Lens. Acta Soc. ophtahl. jap. 64, 442-444 (1960) Ref. ophthal. Lit. 14, Nr. 691 (1960)

Kamei, T.: Studies on the glycogen in the cristalline lens. I. Acta Soc. ophthal. Ja. 62: 1430-1433 (1958)

Kaneko, H.: The glycogen and the fluorescent colour in the cristalline lens. Acta. Soc. Ophthal. Jap. 73: 2673-2683 (1969)

Kaskel, D., Hockwin, O. Metzler, U. und Schedtler, Ch.M.: Glycogen Content in the Rabbit Retina in Relation to Blood Circulation. Ophthal. Res. 5: 177-185 (1973)

Kaskel, D. Schedtler, Ch.M., Hockwin, O., Ciolo, S.: Localization of Glycogen in Lenses of Different Spezies; Demonstrated by Histochemical Methods. Ophthal. Res. 7: 65-72 (1975)

Kaskel, D., Schedtler, Ch.M., Hockwin, O. Ciolo, S.: Phosphorylase 1,4-1,6-Transglucosidase and UDPG-Synthetase in Lenses of Different Species. V. Graefes Arch. Ophthal. 191: 247-264 (1974)

Klethi, J., Mandel, P.: Les uridines diphosphates hexoses du cristallin de rats soumis à un régiment riche en galactose. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 57: 379-381 (1962)

Lojda, Z., Gossrau, R. Schiebler, T.H.: Enzym-histochemische Methoden. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1976)

Mann, S.: Untersuchungen zum Stoffwechsel der Augenlinse; in V. Stackelberg Forschungsberichte des Landes Nordrhein-Westfalen, Nr. 710: 18-27 (1959)

Müller, H.K., Hockwin, O. und Dardenne, U.: Über den Stoffwechsel der Linse. Almanach für die Augenheilkunde. F.J. Lehmanns-Verlag, München (1964)

Nordmann, J.: Klinisches und Experimentelles aus der modernen Linsenforschung. In: Entwicklung und Fortschritt in der Augenheilkunde, 405-419. H. Sautter, Ed. Stuttgart: Enke (1963)

Ohrloff, Ch., Holstege, A., Hockwin, O.: Enzymes involved in the glycogen metabolism of the lens in relation to age, topographic, distribution and association with watersoluble proteins. Ophthal. Res. 8: 227-232 (1976)

Ohrloff, Ch., Hockwin, O. und Kaskel, D.: Glycogen metabolism in bovine lenses. Ophthal. Res. 5: 222-229 (1973)

Pearse, A.G.E.: Histochemistry, Vol. II pp. 1327-1329, App. 18 3rd ed. London (1972)

Rabaey, M.: Glycogen in the lens of bird's eyes. Nature, London 198: 206-207 (1963)

Röchling, U.: Histochemischer Nachweis von Glycogen in der Augenlinse verschiedener Tierarten. Diss., Bonn (1968)

Romeis, B.: Mikroskopische Technik; 16th ed., Oldenburg, München (1968)

Schäfer, B.: Untersuchungen über den Glycogengehalt in Linsen und einzelnen Linsenteilen unterschiedlich alter Rinder. Diss., Bonn (1965)

Schmack, W.: Versuch zur aeroben und anaeroben Glykogensynthese aus Glucose und Fructose in jungen und alten Rinderlinsen. V. Graefes Arch. Ophthal. 170: 44-51 (1966)

Shantaverappa, T.A., Waitzmann, M.B. und Bourne, G.H.: Studies of the distribution of phosphorylase in eyes of the rabbit and the squirrel monkey. Histochemie 7: 8o-95 (1966)

Süllmann, H.: Der Kohlenhydratstoffwechsel der Linsen. Arch. Augenheilk. 11o: 3o3-32o (1937)

Takeuchi, T., Kuriaki, H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. J. Histochem. Cytochem. 3: 153-16o (1955)

Timm, G.: Zur Histochemie der Linse bei seltenen erblichen Enzymopathien des Kohlenhydratstoffwechsels. Klin. Mbl. Augenheilk. 145: 842-852 (1964)

Weckers, R. und Süllmann, H.: Beziehung zwischen Phosphatumsatz und Milchsäurebildung in der Linse. Arch. intern. Med. exper. 13: 483 (1938)

Herrn Professor Dr. med. D. Kaskel danke ich für die Überlassung des Themas und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Ch.-M- Schedtler gilt mein besonderer Dank für ihre freundschaftliche Unterstützung.

7. Lebenslauf

Am 13. Juni 1950 wurde ich als Tochter des Landwirtes Wilhelm Herrmann und seiner Ehefrau Ingeborg Herrmann, geb. Kamp, in Bendorf/Rhein geboren.

1957 Einschulung in die Volksschule Bendorf
1957 Schulwechsel zur Volksschule in Mittenwald/Obb.
1960 altsprachliches Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen
1961 Schulwechsel zum staatl. Görresgymnasium in Koblenz
1969 Abitur am staatl. Görresgymnasium in Koblenz
1969 Beginn des Studiums der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften
1972 Beginn des Medizinstudiums in Bonn
1973 Diplom in Ernährungs- und Haushaltswissenschaften in Bonn
1975 ärztliche Vorprüfung in Bonn
1976 1. Teil der ärztlichen Prüfung in Bonn
1978 2. Teil der ärztlichen Prüfung in Bonn

Am 17. November 1978 heiratete ich den Arzt Dr. med. Volker Hessenbruch aus Hamm.